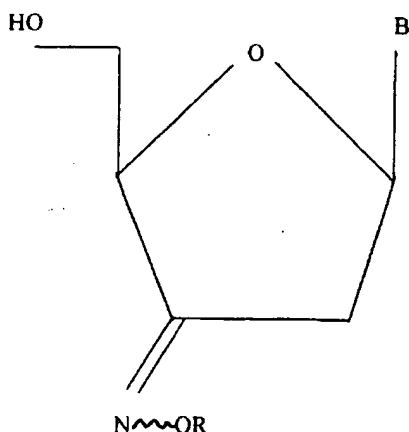


МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ  
С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(51) Международная классификация изобретения <sup>6</sup> : C07H 19/073, 19/173, A61K 31/70	A1	(11) Номер международной публикации: <b>WO 97/49717</b> (43) Дата международной публикации: 31 декабря 1997 (31.12.97)
<p>(21) Номер международной заявки: PCT/RU97/00201</p> <p>(22) Дата международной подачи: 24 июня 1997 (24.06.97)</p> <p>(30) Данные о приоритете: 96112760 25 июня 1996 (25.06.96) RU</p> <p>(71)(72) Заявители и изобретатели: ФЕДОРОВ Иван Игоревич [RU/RU]; 125195 Москва, ул. Фестивальная, д. 15, корп. 4, кв. 17 (RU) [FEDOROV, Ivan Igorovich, Moscow (RU)]. GOSSELIN, Gilles [FR/FR]; Residence Parc d'Arse, bat. F1, 83, rue Calvin, F-34080 Montpellier (FR). DE CLERCQ Eric [BE/BE]; Minderbroederstrat 10, B-Luven (BE). BALZARINI, Jan [BE/BE]; Kostilstraat 24, B-Luven (BE). SOMMADOSSI, Jean-Pierre, [US/US]; G019 Walker Hall, 1670 University Boulevard, Birmingham, AL 35233 (US). IMBACH, Jean-Louis [FR/FR]; 5, rue Eugene Bataillon, F-34095, Montpellier Cedex, (FR).</p> <p>(72) Изобретатели; и</p> <p>(75) Изобретатели / Заявители (только для US): КАЗЬМИНА Эма Максимовна [RU/RU]; 123060 Москва, ул. Расплетина, д. 19, корп. 1, кв. 1 (RU) [KAZMINA, Ema Maximovna, Moscow (RU)]. АРЗАМАСЦЕВ Александр Павлович [RU/RU]; 121099 Москва, Новинский бульвар, д. 15, кв. 37 (RU) [ARZAMASTSEV, Alexandr Pavlovich, Moscow (RU)]. ГУРСКАЯ</p>	<p>Галина Викторовна [RU/RU]; 117437 Москва, ул. Волгина, д. 31, корп. 3, кв. 138 (RU) [GURSKAYA, Galina Viktorovna, Moscow (RU)]. ЯСЬКО Максим Владимирович [RU/RU]; 111396 Москва, Зелёный Проспект, д. 40, корп. 1, кв. 37 (RU) [YASKO, Maxim Vladimirovich, Moscow (RU)]. FARAJ, Abdesslem [US/US]; F167, 17 Ninth Street, Birmingham, AL (US).</p> <p>(74) Агент: ПАТЕНТНО-ПРАВОВАЯ ФИРМА «ЮС»; 103009 Москва, а/я 184, ППФ «ЮС» (RU) [PATENT LAW FIRM "JUS", Moscow (RU)].</p> <p>(81) Указанные государства: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, евразийский патент (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), патент ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), патент OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Опубликована С отчетом о международном поиске.</p>	

(54) Title: 3'-OXIMINO-2',3'-DIDEOXYNUCLEOSIDES AND DERIVATIVES OF THE SAME

(54) Название изобретения: 3'-ОКСИМИНО-2', 3'-ДИДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИДЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ

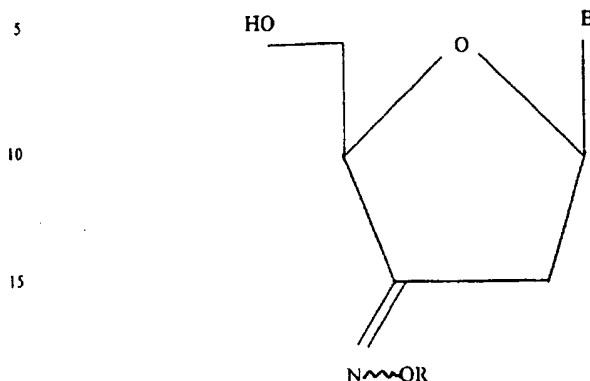


## (57) Abstract

The present invention relates to new 3'-oximino-2',3'-dideoxynucleoside derivatives corresponding to formula (I) where B is substituted or unsubstituted thymine-1-yl, uracil-1-yl, cytosine-1-yl, adenine-9-yl or guanine-9-yl and R is C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl or C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> acyl. This invention may be used to produce substances of this class having an increased activity. The 3'-oximino-2',3'-dideoxynucleosides are synthesised from naturally occurring nucleosides that contain a 2-deoxyribofuranose as their hydrocarbon compound. The position 5' of said 2-deoxyribofuranose is protected by a monomethoxytrityl, dimethoxytrityl or tributyltrimethylsilyl group. The hydroxyl group is then oxidised at position 3' in the keto-group using an oxidiser such as pyridine dichromate or a Dess-Martin reagent, and further oximised in situ (hydroxylamine hydrochloride in pyridine) before suppressing the protecting group at position 5', the yield ranging from 30 to 70 %. Virological tests showed that 3'-oximino-2',3'-dideoxynucleosides and more precisely 3'-oximino-2',3'-dideoxythymidine are active against the human immunodeficiency virus (HIV), the B hepatitis virus and the herpes simplex virus (HSV). These compounds show anti-HIV activity in cells deficient in thymidine kinase, as well as an activity against HSV strains deficient in thymidine kinase.

(57) Реферат

Изобретение касается новых производных 3'-оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозидов формулы:



где В - незамещенный или замещенный тимин-1-ил, урацил-1-ил,

цитозин-1-ил, аденин-9-ил и гуанин-9-ил, а R - C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>

ацил.

Цель - создание более активных веществ этого класса. Синтез 3'-оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозидов ведут из природных нуклеозидов, содержащих 2-дезоксирибофуранозу в качестве углеводной компоненты. Положение 5' 2-дезоксирибофуранозы защищают монометокситритильной, диметокситритильной или третбутилдиметилсилильной группой, затем окисляют гидроксил в положении 3' в кето-группу (окислитель - пиридиния дихромат или реактив Десс-Мартина). оксимируют in situ (гидроксиламина гидрохлорид в пиридине) и удаляют защитную группу в положении 5'. Выход 30 - 70%. Вирологические испытания показывают, что 3'-оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозиды, в особенности 3'-оксимино-2',3'-дидезокситимидин, обладают активностью против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита Б и вируса простого герпеса (ВПГ). Соединения демонстрируют антиВИЧ активность в клетках, дефектных по тимидинкиназе, а также активность против штаммов ВПГ, дефектных по тимидинкиназе.

ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ИНФОРМАЦИИ

Коды, используемые для обозначения стран-членов РСТ на титульных листах брошюр, в которых публикуются международные заявки в соответствии с РСТ.

AT Австрия  
AU Австралия  
BB Барбадос  
BE Бельгия  
BF Буркина Фасо  
BG Болгария  
BJ Бенин  
BR Бразилия  
CA Канада  
CF Центральноафриканская Республика  
BY Беларусь  
CG Конго  
CH Швейцария  
CI Кот д'Ивуар  
CM Камерун  
CN Китай  
CS Чехословакия  
CZ Чешская Республика  
DE Германия  
DK Дания  
ES Испания

FI Финляндия  
FR Франция  
GA Габон  
GB Великобритания  
GN Гвинея  
GR Греция  
HU Венгрия  
IE Ирландия  
IT Италия  
JP Япония  
KP Коре́йская Народно-Демократическая Республика  
KR Коре́йская Республика  
KZ Казахстан  
LI Лихтенштейн  
LK Шри Ланка  
LU Люксембург  
LV Латвия  
MC Монако  
MG Малагаскар  
ML Мали  
MN Монголия

MR Мавритания  
MW Малави  
NE Нигер  
NL Нидерланды  
NO Норвегия  
NZ Новая Зеландия  
PL Польша  
PT Португалия  
RO Румыния  
RU Российская Федерация  
SD Судан  
SE Швеция  
SI Словения  
SK Словакия  
SN Сенегал  
TD Чад  
TG Того  
UA Украина  
US Соединенные Штаты Америки  
UZ Узбекистан  
VN Вьетнам

## 3'-Оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозиды и их производные

Область техники

Изобретение относится к области органической химии и вирусологии и  
5 касается новых аналогов нуклеозидов, содержащих в качестве углеводной  
компоненты 3-оксимино-2-дезоксирiboфуранозу, 3-ацилоксимино-2-  
дезоксирiboфуранозу (ацил= ацетил, пропионил, изобутирил, пивалоил и др.)  
или 3-метоксимино-2-дезоксирiboфуранозу, обладающих противовирусной  
активностью широкого спектра действия в отношении вирусов иммунодефицита  
10 человека (ВИЧ), простого герпеса (ВПГ) и вируса гепатита Б (ВГБ), которые  
могут найти применение в медицине.

Предшествующий уровень техники

Известно применение ретровира (зидовудин, AZT, 3'-азидо-2',3'-  
дидезокситимидин) для лечения пациентов с синдромом приобретенного  
15 иммунодефицита (Машковский, М.Д. *Лекарственные средства*. Москва,  
"Медицина", 1993, т.2, с. 394).

Известно применение ацикловира (ACG, зовиракс) для лечения  
заболеваний, вызванных вирусом простого герпеса (Машковский, М.Д.  
*Лекарственные средства*. Москва, "Медицина", 1993, т.2, с. 391).

20 Также известно применение эпивира (<sup>3</sup>ТС) для лечения синдрома  
приобретенного иммунодефицита человека и его активность в отношении вируса  
гепатита Б. (Shinazy, R.F. Competitive inhibitors of human immunodeficiency virus  
reverse transcriptase. *Perspectives in drug discovery and design*. 1993, 151-180).

Раскрытие изобретения

25 Технической задачей изобретения является создание новых аналогов  
нуклеозидов, обладающих противовирусной активностью широкого спектра  
действия, более избирательным противовирусным действием а также отсутствием  
резистентности к этим аналогам со стороны мутантных штаммов вирусов или  
клеток, дефицитных в отношении фосфорилирующих ферментов.

30 Соединения в соответствии с настоящим изобретением получены  
известными в органической химии методами, такими как окисление,  
окисмирование, ацилирование, введение защитных групп и их удаление в

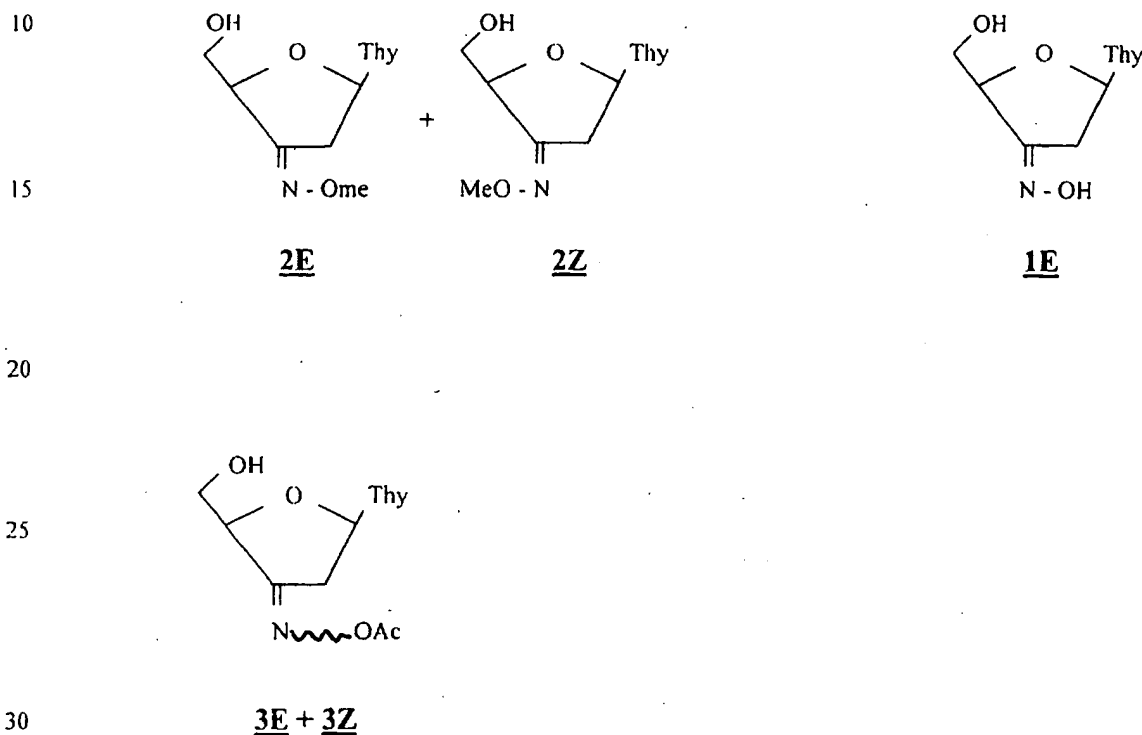
- соответствии со схемами 1 и 2. Формулы и нумерация некоторых синтезированных соединений приведены на рис. 1. Синтез 3'-оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозидов ведут из природных нуклеозидов, содержащих 2-дезоксирибофуранозу в качестве углеводной компоненты. Положение 5' 2-дезоксирибофуранозы защищают монометокситритильной, диметокситритильной или третбутилдиметилсилильной группой, затем окисляют гидроксил в положении 3' в кето-группу (окислитель-пиридиния дихромат или реактив Десс-Мартина), оксимируют *in situ* (гидроксиламина гидрохлорид в пиридине) и удаляют защитную группу в положении 5'. Выход 30-70%.
- 10 Вирусологические испытания показывают, что 3'-оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозиды, в особенности 3'-оксимино-2',3'-дидезокситимидин, обладают активностью против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита Б и вируса простого герпеса (ВПГ). Соединения демонстрируют антиВИЧ активность в клетках, дефектных по тимидинкиназе, а также активность
- 15 против штаммов ВПГ, дефектных по тимидинкиназе.

Нижеследующие примеры характеризуют заявляемые соединения.

**Пример 1. Синтез 3'-оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозидов, 3'-ацетоксимино-2',3'-дидезоксинуклеозидов и 3'-метоксимино-2',3'-дидезоксинуклеозидов, содержащих 5-замещенные производные урацила в качестве нуклеиновых оснований (на примере производных тимина).**

5

Схема 1



3'-Кето-2',3'-дидезокситимидин 29 был синтезирован, как описано в Froeclish, M.L.; Swartling, D.J.; Lind, R.E.; Mott, A.W.; Bergstrom, D.E. An improved synthesis of 3'-keto-5'-O-tritylthymidine. Nucleosides, Nucleotides 1989, 8, 1529-1535.

Окисление реагентом Десс-Мартина проводили, как описано в Dess, D.B., Martin, J.C. Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones. J. Org. Chem., 48, 1983, 4155-415.

ЯМР спектры были получены на спектрометре Bruker AC 250 в растворе  $\text{CDCl}_3$  или  $\text{D}_2\text{O}$  с использованием ТМС или ацетонитрила соответственно в качестве внутреннего стандарта. В описании спектров использованы следующие

сокращения: с - синглет, дд - дублет дублетов, ддд - дублет дублетов дублетов, м - мультиплет, к - квартет, пт- псевдотриплет. Сигналы защитных групп не приводились при описании спектров. Масс-спектры снимались в позитивном или негативном режиме на спектрометре Jeol DX 300 с операционной системой JMA-  
5 DA 5000 и использованием нитробензилового спирта в качестве матрицы. УФ-спектры были получены на Uvicon-931 спектрофотометре в воде. ТСХ проводилась на пластинах с силикагелем (Merck, Art. 5554). Колоночная хроматография проводилась на Silica Gel 60 (Merck, Art. 15111) с использованием хлористого метилена и метанола в качестве элюентов.

10 Температуры плавления были измерены на аппарате Reichert (Австрия) и не были исправлены. Обращенно-фазовая хроматография проводилась на LiChroprep RP-18 (40-63 мкм, Merck, Art. 13900). Рентгеновская съемка была выполнена на дифрактометре CAD-4 (Nonius, Голландия)). Структуры были решены прямым методом и уточнены методом наименьших квадратов с  
15 анизотропным приближением для неводородных атомов. Координаты водородных атомов были определены из разностных синтезов Фурье и уточнены с использованием изотропных температурных факторов. Окончательные значения R-факторов были 4,2% и 3,0% для соединений 1E и 2Z соответственно. Кристаллы этих соединений были получены из воды.

20

#### 5'-Монометокситритил-3'-оксимино-2',3'-дидезокситимидин

(30E+30Z). К насыщенному раствору гидроксилamina гидрохлорида в пиридине (5 мл) было добавлено соединение 29 (1,45 г, 2,83 ммол). Через 15 минут реакционная смесь была упарена в вакууме, и к остатку были добавлены  
25 дихлорметан (50 мл) и вода (50 мл). После экстракции органический слой был высушен безводным сульфатом натрия, упарен и переупарен с толуолом. После колоночной хроматографии на силикагеле (градиент метанола в дихлорметане, 0 → 2,5%) было получено 1,39 г смеси 30E+30Z в виде бесцветной пены (93%).

<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 30E 7,62 к (H6, 1H), 7,20 пт (H1', 1H), 4,70 м (H4', 1H),  
30 3,61 дд (H5', J<sub>5',4'</sub>=3,0 Hz, J<sub>5',5''</sub>=-10,5 Hz, 1H), 3,48 дд (H5'', J<sub>5'',4'</sub>=1,8 Hz, 1H), 3,55 дд (H2'', J<sub>2'',1'</sub>=6,8 Hz, J<sub>2'',2'</sub>=-18,7 Hz, 1H), 2,79 ддд (H2', J<sub>2',1'</sub>=7,7 Hz, J<sub>2',4'</sub>=1,9 Hz, 1H), 1,36 д (Me-C5, 3H). 30Z 7,76 к (H6, 1H), 6,39 пт (H1', 1H), 4,94 м (H4', 1H), 3,94 дд (H5', J<sub>5',4'</sub>=1,7 Hz, J<sub>5',5''</sub>=-10,2 Hz, 1H), 3,29 дд (H5'', J<sub>5'',4'</sub>=1,9 Hz, 1H), 3,23

дд ( $H2''$ ,  $J_{2'',1''}=6,5$  Hz,  $J_{2'',2''}=-16,0$  Hz, 1H). 3.06 ддд ( $H2'$ ,  $J_{2',1'}=9,2$  Hz,  $J_{2',4'}=1,9$  Hz, 1H), 1.29 д (Me-C5, 3H).  $m/e$  (FAB MS < 0) 527 (M-H)<sup>-</sup>.

**3'-Оксимино-2',3'-дидезокситимидин (1E).** Раствор смеси соединений

5 **30E+30Z** (193 мг, 0,37 ммол) в 80% водной уксусной кислоте (5 мл) перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре, упаривали досуха и переупаривали с толуолом. К остатку добавляли воду (5 мл), дихлорметан (5 мл), водный слой отделяли и промывали дихлорметаном (5 мл), фильтровали через влажный бумажный фильтр и упаривали досуха. Остаток очищали обращенно-  
10 фазовой хроматографией (градиент метанола в воде, 0→5%). После лиофильной сушки было получено 64 мг соединения 1E в виде бесцветной пены (68%). Последующая кристаллизация из воды позволила получить 43 мг кристаллического 1E. Т. пл. 117-119°C.  $^1H$  ЯМР ( $D_2O$ ): 7,57 к ( $H6$ , 1H), 6,31 пт ( $H1'$ , 1H), 4,64 м ( $H4'$ , 1H), 3,89 дд ( $H5'$ ,  $J_{5',4'}=2,7$  Hz,  $J_{5',5''}=-12,8$  Hz, 1H), 3,82 дд  
15 ( $H5''$ ,  $J_{5'',4''}=4,1$  Hz, 1H), 3,30 дд ( $H2''$ ,  $J_{2'',1''}=7,4$  Hz,  $J_{2'',2''}=-19,1$  Hz, 1H), 2,90 ддд ( $H2'$ ,  $J_{2',1'}=6,3$  Hz,  $J_{2',4'}=1,6$  Hz, 1H), 1,82 д (Me-C5, 3H).  $^{13}C$  ЯМР (20%  $CD_3OD$  в  $H_2O$ ): 168,2 (C4), 161,6 (C3'), 153,4 (C2), 139,2 (C6), 113,8 (C5), 85,1 (C1'), 81,0 (C4'), 62,4 (C5'), 34,9 (C2'), 12,6 (Me-C5).  $m/e$  (FAB MS < 0) 254 (M-H)<sup>-</sup>, (FAB MS > 0) 256 (M+H)<sup>+</sup>. УФ:  $\lambda_{max}=267$  нм ( $\epsilon$  96400). Элементный анализ: найдено, %: C -  
20 43,65, H - 5,47, N - 15,37; вычислено. %: C - 43,96, H - 5,52, N - 5,37.  $C_{10}H_{13}N_3O_5 \cdot H_2O$ . Рентгеноструктурный анализ: конформационные параметры 1E представлены в Табл. 1. Трехмерная структура 1E представлена на рис. 2.

25 **5'-Монометокситритил-3'-метоксимино-2',3'-дидезокситимидин (31E+31Z).**

Реакция соединения 29 (1,45 г, 0,88 ммол) с насыщенным раствором  
О-метилгидроксиламина гидрохлорида в пиридине (2 мл) с последующей  
очисткой на силикагеле (градиент метанола в дихлорметане, 0 → 2%), как описано  
30 для **30E+30Z** позволила получить 431 мг смеси **31E+31Z** в виде бесцветной пены (91%).  $^1H$  ЯМР ( $CDCl_3$ ): 31E 7,58 к ( $H6$ , 1H), 6,38 дд ( $H1'$ , 1H), 4,65 м ( $H4'$ , 1H), 3,97 с (N-OMe, 3H), 3,59 дд ( $H5'$ ,  $J_{5',4'}=3,1$  Hz,  $J_{5',5''}=-10,4$  Hz, 1H), 3,40 дд ( $H5''$ ,

$J_{5'',4''}=2.0$  Hz, 1H), 3.44 дд ( $H2''$ ,  $J_{2'',1''}=6.8$  Hz,  $J_{2'',2''}=-18.5$  Hz, 1H), 2.72 ддд ( $H2'$ ,  $J_{2',1'}=7.6$  Hz,  $J_{2',4'}=2.0$  Hz, 1H), 1.37 д (Me-C5, 3H).

**31Z** 7.74 к ( $H6$ , 1H), 6.39 дд ( $H1'$ , 1H), 4.82 м ( $H4'$ , 1H), 3.89 с (N-OMe, 3H), 3.84 дд ( $H5'$ ,  $J_{5',4'}=1.8$  Hz,  $J_{5',5''}=-10.2$  Hz, 1H), 3.23 дд ( $H5''$ ,  $J_{5'',4''}=1.5$  Hz, 1H), 3.19 дд ( $H2''$ ,  $J_{2'',1''}=6.3$  Hz,  $J_{2'',2''}=-16.3$  Hz, 1H), 3.03 ддд ( $H2'$ ,  $J_{2',1'}=8.9$  Hz,  $J_{2',4'}=1.3$  Hz, 1H), 1.30 д (Me-C5, 3H). m/e (FAB MS < 0) 540 (M-H)<sup>+</sup>.

**3'-Метоксимино-2',3'-дидезокситимилин (2E+2Z).** Известны

опубликованные данные о синтезе соединений **2E+2Z** (Tronshet, J.M.J.; Zsely, M.; Lassout, O.; Barbalat-Rey, F.; Komaromi, I.; Geoffroy, M. Synthesis and anti-HIV activity of further examples of 1-[3-deoxy-3-(N-hydroxylamino)-b-D-threo- (and b-D-erythro-)-pentofuranosyl]thymine derivatives. *J. Carbohydrate Chemistry*, 1995, 14, 575-588). Однако в известных источниках не приводятся данных по антиВИЧ активности указанных соединений.

Раствор смеси соединений **31E+31Z** (222 мг, 0.41 ммол) в 80% водной уксусной кислоте (5 мл) перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре и обрабатывали, как описано для соед. **1E**. Остаток очищали обращенно-фазовой хроматографией (градиент метанола в воде, 0 → 7%). После лиофильной сушки было получено 79 мг смеси соединений **2E+2Z** в виде бесцветной пены (72%).

Последующая кристаллизация из воды позволила получить 45 мг кристаллического **2Z**. Т. пл. 121-123°C. <sup>1</sup>H ЯМР ( $D_2O$ ): **2E** 7.55 к ( $H6$ , 1H), 6.28 дд ( $H1'$ , 1H), 4.68 м ( $H4'$ , 1H), 3.86 с (N-OMe, 3H), 3.90 дд ( $H5'$ ,  $J_{5',4'}=2.9$  Hz,  $J_{5',5''}=-13.0$  Hz, 1H), 3.82 дд ( $H5''$ ,  $J_{5'',4''}=4.3$  Hz, 1H), 3.28 дд ( $H2''$ ,  $J_{2'',1''}=7.3$  Hz,  $J_{2'',2''}=-19.2$  Hz, 1H), 2.92 ддд ( $H2'$ ,  $J_{2',1'}=6.1$  Hz,  $J_{2',4'}=1.9$  Hz, 1H), 1.82 д (Me-C5, 3H). **2Z** 7.71 к ( $H6$ , 1H), 6.27 дд ( $H1'$ , 1H), 4.65 м ( $H4'$ , 1H), 3.82 с (N-OMe, 3H), 4.08 дд ( $H5'$ ,  $J_{5',4'}=3.3$  Hz,  $J_{5',5''}=-12.6$  Hz, 1H), 3.80 дд ( $H5''$ ,  $J_{5'',4''}=2.3$  Hz, 1H), 3.08 дд ( $H2''$ ,  $J_{2'',1''}=6.5$  Hz,  $J_{2'',2''}=-17.4$  Hz, 1H), 2.90 ддд ( $H2'$ ,  $J_{2',1'}=8.2$  Hz,  $J_{2',4'}=1.8$  Hz, 1H), 1.84 д (Me-C5, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (20%  $CD_3OD$  в  $H_2O$ ): **2E** 166.9 (C4), 159.5 (C3'), 152.0 (C2), 139.0 (C6), 112.1 (C5), 84.6 (C1'), 79.8 (C4'), 62.3 (C5'), 61.1 (OMe), 33.1 (C2'), 11.9 (Me-C5). **2Z** 166.8 (C4), 159.8 (C3'), 152.1 (C2), 137.7 (C6), 112.7 (C5), 83.4 (C1'), 79.6 (C4'), 62.4 (C5'), 60.8 (OMe), 35.0 (C2'), 12.0 (Me-C5). m/e (FAB MS < 0) 268 (M-H)<sup>+</sup>, (FAB MS > 0) 270 (M+H)<sup>+</sup>. УФ:  $\lambda_{max}=267$  нм ( $\epsilon$  96500). Элементный анализ: найдено. %: C - 44.59,



H - 5,93, N - 13,93; вычислено, %: C - 44,59, H - 6,12, N - 14,18.

$C_{11}H_{15}N_3O_5 \cdot 1,5H_2O$ . Рентгеноструктурный анализ: конформационные параметры 2Z представлены в Табл. 1. Трехмерная структура 1E представлена на рис. 2.

5

**5'-Монометокситритил-3'-ацетоксимино-2',3'-дидезокситимидин  
(32E+32Z).**

К раствору смеси 30E+30Z (460 мг, 0,87 ммол) в пиридине (5 мл) при  
10 перемешивании при 0°C был добавлен ацетил хлорид (71 мкл, 1,0 ммол).  
Реакционной смеси дали согреться до комнатной температуры и через 6 часов  
добавили насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия (2 мл). Раствор  
был упарен, и остаток был обработан и очищен на силикагеле, как описано для  
30E+30Z (градиент метанола в дихлорметане, 0 → 2%). Было получено 327 мг  
15 смеси 32E+32Z в виде бесцветной пены (66%).  $^1H$  ЯМР ( $CDCl_3$ ): 32E 7,60 к (H6,  
1H), 6,28 дд (H1', 1H), 4,82 м (H4', 1H), 3,74 дд (H5',  $J_{5',4'}=3,0$  Hz,  
 $J_{5',5''}=-10,7$  Hz, 1H), 3,48 дд (H5'',  $J_{5'',4''}=2,1$  Hz, 1H), 3,62 дд (H2'',  $J_{2'',1''}=6,5$   
Hz,  $J_{2'',2'}=-18,6$  Hz, 1H), 3,13 ддд (H2',  $J_{2',1'}=7,8$  Hz,  $J_{2',4'}=1,8$  Hz, 1H), 2,23 с  
(N-OCOMe, 3H), 1,37 д (Me-C5, 3H). 32Z 7,73 к (H6, 1H), 6,48 дд (H1', 1H),  
20 4,92 м (H4', 1H), 3,94 дд (H5', 1H), 3,47 дд (H5'',  $J_{5'',4''}=1,8$  Hz,  $J_{5',5''}=-10,4$  Hz, 1H),  
3,39 дд (H2'',  $J_{2'',1''}=6,1$  Hz,  $J_{2'',2'}=-17,1$  Hz, 1H), 3,18 ддд (H2',  $J_{2',1'}=9,2$  Hz,  $J_{2',4'}=1,1$   
Hz, 1H), 1,94 с (N-OCOMe, 3H), 1,34 д (Me-C5, 3H).  
m/e (FAB MS < 0) 568 (M-H).

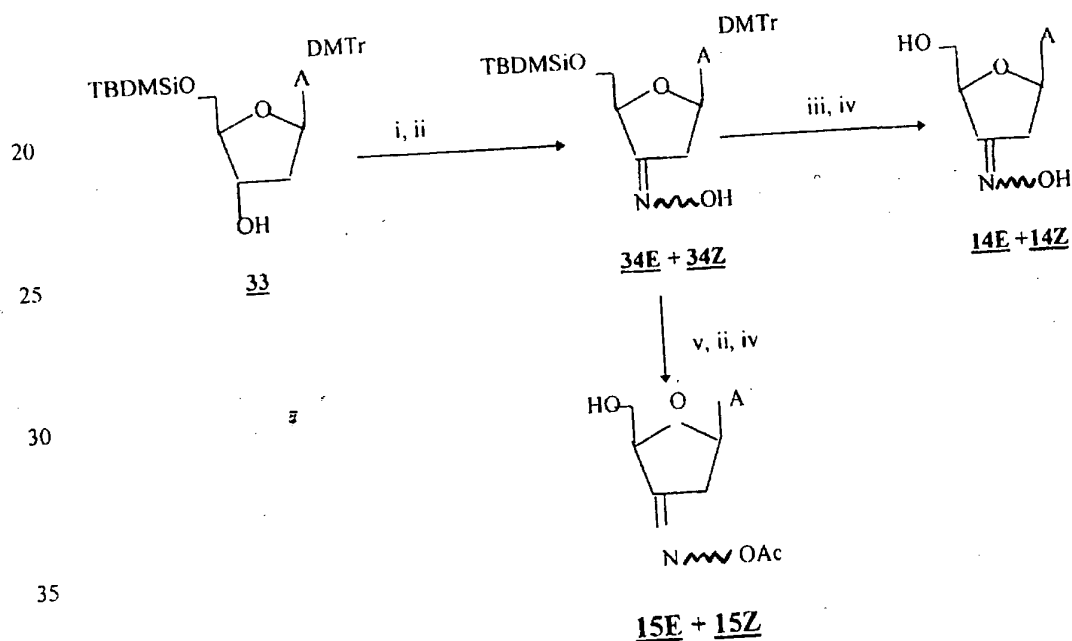
25 **3'-Ацетоксимино-2',3'-дидезокситимидин (3E+3Z).** Раствор смеси  
соединений 32E+32Z (340 мг, 0,60 ммол) в 80% водной уксусной кислоте (5 мл)  
перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре и обрабатывали, как  
описано для соед. 1E. После очистки хроматографией на силикагеле (градиент  
аcetона в дихлорметане, 0 → 50%) и лиофильной сушки было получено 110 мг  
30 смеси соединения 3E+3Z в виде бесцветной гигроскопичной пены (62%).

$^1H$  ЯМР ( $D_2O$ ): 3E 7,58 к (H6, 1H), 6,30 пт (H1', 1H), 4,78 м (H4', 1H), 3,98  
дд (H5',  $J_{5',4'}=2,7$  Hz,  $J_{5',5''}=-16,0$  Hz, 1H), 3,91 дд (H5'',  $J_{5'',4''}=3,9$  Hz, 1H), 3,50 дд

- (H2'', J<sub>2'',1'</sub>=7.4 Hz, J<sub>2'',2'</sub>=-19.6 Hz, 1H), 3.13 ддд (H2', J<sub>2',1'</sub>=6.2 Hz, J<sub>2',4'</sub>=1.3 Hz, 1H), 2.16 с (N-OCOMe, 3H), 1.83 д (Me-C5, 3H). 3Z 7.73 к (H6, 1H), 6.34 дд (H1', 1H), 5.00 м (H4', 1H), 3.98 дд (H5', J<sub>5',4'</sub>=3.2 Hz, J<sub>5',5''</sub>=-12.9 Hz, 1H), 3.92 дд (H5'', J<sub>5'',4'</sub>=2.8 Hz, 1H), 3.25 дд (H2'', J<sub>2'',1'</sub>=6.3 Hz, J<sub>2'',2'</sub>=-17.7 Hz, 1H), 3.10 ддд (H2', J<sub>2',1'</sub>=8.2 Hz, J<sub>2',4'</sub>=1.3 Hz, 1H), 1.82 с (N-OCOMe, 3H), 1.83 д (Me-C5, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (20% CD<sub>3</sub>OD в H<sub>2</sub>O): 3E 172.0 (COCH<sub>3</sub>), 168.9 (C3'), 166.9 (C4), 152.0 (C2), 138.3 (C6), 112.2 (C5), 84.9 (C1'), 80.4 (C4'), 62.1 (C5'), 34.5 (C2'), 19.0 (COCH<sub>3</sub>), 11.9 (Me-C5). m/e (FAB MS < 0) 296 (M-H)<sup>-</sup>, (FAB MS > 0) 298 (M+H)<sup>+</sup>. УФ: λ<sub>max</sub>=267 нм (ε 95900). Элементный анализ: найдено, %: C - 45.73, H - 5.25, N - 13.20; вычислено, %: C - 45.72, H - 5.43, N - 13.32. C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> · H<sub>2</sub>O.

**Пример 2** - Синтез 3'-оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозидов и ацетоксимино-2',3'-дидезоксинуклеозидов, содержащих цитозин, аденин и гуанин в качестве нуклеиновых оснований (на примере производных аденина).

Схема 2



- i - реагент Десс-Мартина; ii - гидроксиламин гидрохлорид / Ру;  
 iii - тетрабутиламмония фторид / Tl<sup>+</sup>F<sup>-</sup>; iv - 80% уксусная кислота;  
 v - AcCl / Ру

**N<sup>6</sup>-Диметокситритил-5'-третбутилдиметилсилил-3'-оксимино-2',3'-дидезоксиаденозин (34E+34Z).** К раствору N<sup>6</sup>-диметокситритил-5'-третбутилдиметилсилил-2'-дидезоксиаденозина **33** (447 мг, 0,67 ммол) в дихлорметане (6 мл) при 0°C был добавлен реактив Десс-Мартина (530 мг, 1,25 ммол) в дихлорметане (6 мл) и пиридин (0,1 мл). Раствору позволили согреться до комнатной температуры и через 30 мин был добавлен насыщенный водный раствор тиосульфата натрия (5 мл). Органический слой был отделен, насыщенный раствор гидроксиламина гидрохлорида в пиридине (2 мл) был добавлен, и раствор был упарен в вакууме и переупарен с толуолом. К остатку был добавлен насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия (10 мл) и дихлорметан (10 мл). Органический слой после экстракции был промыт водой (2 x 10 мл), высушен с сульфатом натрия и упарен досуха. После очистки хроматографией на силикагеле (градиент метанола в дихлорметане, содержащем следы триэтиламина, 0 → 2 %) было получено 227 мг смеси **34E+34Z** в виде бесцветной пены (49,8%). <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): **34E** 8,18 с (H8, 1H), 8,05 с (H2, 1H), 6,42 пт (H1', 1 H), 4,98 м (H4', 1H), 4,03 дд (H5', J<sub>5',4'</sub>=2,3 Hz, J<sub>5',5''</sub>=-11,4 Hz, 1H), 3,88 дд (H5'', J<sub>5'',4'</sub>=4,1 Hz, 1H), 3,54 дд (H2'', J<sub>2'',1'</sub>=7,0 Hz, J<sub>2'',2'</sub>=-18,4 Hz, 1H), 3,09 ддд (H2', J<sub>2',1'</sub>=6,7 Hz, J<sub>2',4'</sub>=1,9 Hz, 1H). **34Z** 8,29 с (H8, 1H), 8,05 с (H2, 1H), 6,36 дд (H1', 1H), 4,66 м (H4', 1H), 4,22 дд (H5', J<sub>5',4'</sub>=2,4 Hz, J<sub>5',5''</sub>=-11,0 Hz, 1H), 4,02 дд (H5'', J<sub>5'',4'</sub>=2,1 Hz, 1H), 3,24 дд (H2'', J<sub>2'',1'</sub>=6,0 Hz, J<sub>2'',2'</sub>=-15,9 Hz, 1H), 3,03 ддд (H2', J<sub>2',1'</sub>=8,9 Hz, J<sub>2',4'</sub>=1,6 Hz, 1H). m/e (FAB MS < 0) 680 (M-H)<sup>+</sup>.

**3'-Оксимино-2',3'-дидезоксиаденозин (14E+14Z).** К раствору смеси соединений **34E+34Z** (226 мг, 0,33 ммол) в тетрагидрофуране (5 мл) при 0°C был добавлен 1,1М раствор тетрабутиламмония фторида в тетрагидрофуране (0,33 мл). Раствору позволили согреться до комнатной температуры и упарили досуха. После очистки хроматографией на силикагеле (градиент метанола в дихлорметане 0 → 4 %), содержащем следы триэтиламина) и упаривания остаток был растворен в 20 мл 80% водной уксусной кислоты, перемешан 30 мин, упарен досуха и дважды переупарен с толуолом. К остатку была добавлена вода (10 мл) и дихлорметан (10 мл). Водный слой был отделен и промыт дихлорметаном (3 x 10

мл). После лиофилизации водного слоя получено 64 мг смеси 14E+14Z в виде бесцветной пены (73,5%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 14E 8,29 с (H8, 1H), 8,16 с (H2, 1H), 6,50 пт (H1', 1H), 4,70 м (H4', 1H), 3,96 дд (H5',  $J_{5',4'}=2,4$  Hz,  $J_{5',5''}=-12,6$  Hz, 1H), 3,84 дд (H5'',  $J_{5'',4''}=4,0$  Hz, 1H), 3,58 дд (H2'',  $J_{2'',1'}=7,1$  Hz,  $J_{2'',2''}=-18,7$  Hz, 1H), 3,48-3,25 м (H2', 1H). 14Z 8,26 с (H8, 1H), 8,16 с (H2, 1H), 6,44 дд (H1', 1H), 4,70 м (H4', 1H), 4,21 дд (H5',  $J_{5',4'}=2,8$  Hz,  $J_{5',5''}=-12,6$  Hz, 1H), 3,92 дд (H5'',  $J_{5'',4''}=1,8$  Hz, 1H), 3,48-3,25 м (H2', H2'', 2H).

m/e (FAB MS < 0) 263 (M-H)<sup>-</sup>, (FAB MS > 0) 265 (M+H)<sup>+</sup>. УФ:  $\lambda_{\text{max}}=260$  нм ( $\epsilon$  15000).

10 3'-Ацетоксимино-2',3'-дидезоксиаденозин (15E+15Z). К раствору смеси 34E+34Z (82 мг, 0,095 ммол) в пиридине (2 мл) при перемешивании при 0°C был добавлен ацетил хлорид (18 мкл, 0,25 ммол). Затем реакционной смеси дали согреться до комнатной температуры и через 1 час добавили насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия (1 мл). Раствор был упарен в вакууме, и остаток  
15 был обработан и очищен на силикагеле, как описано для 32E+32Z (градиент метанола в дихлорметане 0 → 3%, содержащем следы триэтиламина). К остатку (60 мг, 0,083 ммол) в тетрагидрофуране (2 мл) при 0°C был добавлен 1,1 М раствор тетрабутиламмония фторида (100 мкл) и далее поступали, как описано для 14E+14Z. После очистки хроматографией на силикагеле (градиент метанола в  
20 дихлорметане 0 → 4 %, содержащем следы триэтиламина) сухой остаток был растворен в 5 мл 80% водной уксусной кислоты и далее поступали, как описано для 14E+14Z. После лиофилизации получено 9 мг смеси 15E+15Z в виде желтоватой пены (32%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 15E 8,24 с (H8, 1H), 8,17 с (H2, 1H), 6,48 пт (H1', 1H), 4,66 м (H4', 1H), 3,90 дд (H5',  $J_{5',4'}=2,4$  Hz,  $J_{5',5''}=-12,2$  Hz, 1H), 3,80 дд (H5'',  $J_{5'',4''}=4,1$  Hz, 1H), 3,67 дд (H2'',  $J_{2'',1'}=6,9$  Hz,  $J_{2'',2''}=-18,8$  Hz, 1H), 3,55 дд (H2',  $J_{2',1'}=6,9$  Hz,  $J_{2',4'}=1,7$  Hz, 1H), 2,20 с (N-OCOMe, 3H). 15Z 8,30 с (H8, 1H), 8,17 с (H2, 1H), 6,42 дд (H1', 1H), 4,60 м (H4', 1H), 3,98 дд (H5',  $J_{5',4'}=2,6$  Hz,  $J_{5',5''}=-12,3$  Hz, 1H), 4,92 дд (H5'',  $J_{5'',4''}=4,0$  Hz, 1H), 3,48 м (H2'', 1H), 3,05 м (H2', 1H). m/e (FAB MS < 0) 305 (M-H)<sup>-</sup>, (FAB MS > 0) 307 (M+H)<sup>+</sup>. УФ:  $\lambda_{\text{max}}=260$   
30 нм ( $\epsilon$  14800).

**Пример 3. Определение противовирусной активности и цитостатического действия в культурах клеток.**

### ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ.

Противовирусные исследования, за исключением исследований с ВИЧ-1 и  
5 ВИЧ-2, основывались на ингибировании вирус-индуцированной  
цитопатогенности в культурах клеток E<sub>6</sub>SM или HEL, как описано в Schols, D.,  
De Clercq, E., Balzarini, J., Baba, M., Witvrouw, M., Hosoya, M., Andrei, G., Snoeck,  
R., Neyts, J., Pauwels, R., Nagry, M., Gyorgyi-Edelenyi, J., Macholich, R., Horvath, I.,  
Low, M., Gorog, S. Sulphated polymers are potent and selective inhibitors of various  
10 enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular  
stomatitis virus, respiratory syncytial virus, and toga-arena- and retroviruses. *Antiviral  
Chem. Chemother.* **1990**, 1, 233-240; De Clercq, E., Descamps, J., Verhelst, G., Walker,  
R.T., Jones, A.S., Torrence, P.F., Shugar, D. Comparative efficacy of antiherpes drug  
against different strains of herpes simplex virus. *J. Infect. Dis.*, **1980**, 141, 563-574; De  
15 Clercq, E., Holy, A., Rosenberg, G., Sakuma, T., Balzarini, J., Maudgal, P.C. A novel  
selective broad-spectrum anti-DNA virus agent. *Nature*. **1986**, 323, 464-467.

Соответствующие культуры клеток в микролитровых количествах были  
инокулированы со 100 CCID<sub>50</sub> вируса. При этом 1 CCID<sub>50</sub> вируса было  
достаточным для инфицирования 50% культуры клеток. После одного часа  
20 периода абсорбции остаточный вирус был удален и клеточные культуры были  
ингибированы в присутствии различных концентраций (400, 200, 100, ... мкг/мл)  
исследуемых соединений. Цитопатогенное действие вируса оценивалось по  
завершению цитопатогенного процесса в контрольной инфицированной вирусом  
культуре клеток.

### ИНГИБИРОВАНИЕ ВИЧ-ИНДУЦИРОВАННОГО ОБРАЗОВАНИЯ ГИГАНТСКИХ КЛЕТОК.

Культура клеток СЕМ была суспендирована в концентрации 250.000-  
300.000 клеток/мл культуральной среды и инфицирована 100 CCID<sub>50</sub> ВИЧ-1 (III<sub>B</sub>)  
или ВИЧ-2 (ROD). Затем 100 мкл суспензии инфицированных клеток были  
30 перенесены в планшет на 200 мкл, содержащий по 100 мкл соответственно

разбавленных растворов исследуемых соединений. Через 4 дня инкубации при 37°C образование синцития в культурах клеток было изучено, как описано в Balzarini, J., Naesens, L., Slachmuylders, J., Niphuis, H., Rosenberg, I., Holy, A., Schellekens, H., De Clercq, E. 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) effectively inhibits retrovirus replication *in vitro* and simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *AIDS*. 1991, 5, 21-28.

#### ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ.

Цитостатическая активность была изучена как описано в De Clercq, E., Balzarini, J., Torrence, P.F., Mertes, M.P., Schmidt, C.L., Shugar, D., Barr, P.J., Jones, A.S., Verhelst, G., Walker, R.T. Thymidilate synthetase as a target enzyme for the inhibitory activity of 5-substituted-2'-deoxyuridines on mouse leukemia L-1210 cell growth. *Mol. Pharmacol.*, 1981, 19, 321-330. Цитостатическую активность выражали, как концентрацию соединения, которая уменьшает число выживших клеток на 50% (CC<sub>50</sub>). Измерения цитотоксичности основывались на микроскопически видимом изменении нормальной клеточной морфологии (E<sub>6</sub>SM) или ингибировании нормального роста клеток (HEI), как описано в De Clercq, E., Holy, A., Rosenberg, G., Sakuma, T., Balzarini, J., Maudgal, P.C. A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent. *Nature*. 1986, 323, 464-467.

#### АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА Б.

Человеческие клетки 2.2.15, зараженные ВГБ были выделены из клеточной линии HEP G2 и культивированы, как описано в Korba, B.E.; Guerin, J.L. Use of standard cell culture assay to assess activities of nucleoside analogs against hepatitis B virus replication. *Antiviral Res.* 1992, 19, 55-70. Клетки, культивируемые в модифицированной среде Дубелько с добавлением 4% бычьей сыворотки и 0.5 мМ глутамина, обрабатывали исследуемыми веществами в течение 9 дней. Культуральную жидкость меняли каждые 3 дня. Клетки HEP G2 и необработанные 2.2.15 клетки служили в качестве негативного и позитивного контроля соответственно. Затем среда была удалена, и клетки лизированы. Полная внутриклеточная ДНК была выделена и подвергнута анализу "Саузерн блот", используя <sup>32</sup>P-меченую специфичную пробу (рТНВВ плазида содержит геном ВГБ полной длины). Определяли ингибирование вирусного репликативного

ДНК-интермедиата в обработанных клетках в сравнении с контролем. Изучение цитотоксичности соединений проводили в клетках HEP G2, находящихся в планшете, измерением проникновения в клетки нейтрального красного красителя. Клетки были подсчитаны и обработаны в тех же условиях, что и клетки, использованные для определения противовирусной активности.

### Результаты.

АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ ВИЧ. АнтиВИЧ активность синтезированных соединений была изучена с использованием ВИЧ-1 (штамм III<sub>B</sub>) и ВИЧ-2 (штамм ROD) в культурах человеческих MT-4, CEM/0 и CEM/TK<sup>+</sup> клеток (Табл. 2).

Соединения 1E, 3E+3Z показали выраженную активность против равно ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в культурах клеток MT-4 и CEM/0. При этом активность против ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в MT-4 клетках была в 10-20 раз выше, чем в CEM/0 клетках. Цитостатическая активность исследуемых соединений была в 5-15 раз выше для MT-4 клеток, чем для CEM/0 клеток. Величины ингибирующих концентраций для этих веществ были в 50-500 раз выше, чем для известного структурного аналога 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидина (AZT, "Ретровир"). 3'-Метоксимино-2',3'-дидезокситимидины 2E+2Z были менее активны. Соединения 1E, 3E+3Z также проявили активность в культуре клеток CEM/TK<sup>+</sup>, дефицитных по тимидинкиназе (EC<sub>50</sub> 20 мкг/мл и ≥20 мкг/мл), в то время как AZT был полностью неактивен в этой линии клеток.

3'-Ацилоксиминопроизводные-2',3'-дидезоксинуклеозидов (соединения 4a-4e) показали сходные величины ингибирующих концентраций.

3'-(О)ксимино-2',3'-дидезоксинуклеозиды, содержащие другие природные нуклеиновые основания (соединения 11E+11Z, 14E+14Z, 15E+15Z) также показали анти-ВИЧ активность в CEM клетках, хотя и меньшую, чем 1E и 3E+3Z. Соединения 11E+11Z были столь же активны в культуре CEM/TK<sup>+</sup> клеток, как и CEM/0 клеток (EC<sub>50</sub> 16-19 мкг/мл и 58 мкг/мл соответственно), что подтверждает, что их активность не зависит или мало зависит от внутриклеточного фосфорилирования, катализируемого тимидинкиназой.

### АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ ВПГ.

АнтиВПГ активность синтезированных соединений была изучена с использованием трех штаммов ВПГ-1 и четырех штаммов ВПГ-2 в культурах E<sub>6</sub>SM и HEL клеток (Табл. 3). Соединение 1E показало выраженные ингибиторные свойства в отношении ряда штаммов ВПГ-1 (EC<sub>50</sub> 0,4-1,3 мкг/мл) и несколько меньшую активность в отношении ВПГ-2 (EC<sub>50</sub> 0,5-11,0 мкг/мл). Соединение 1E и 3E+3Z были менее токсичны для клеток, в которых изучалась антигерпетическая активность (> 400 мкг/мл и 400 мкг/мл соответственно), чем АСГ в 5-(E) бромвинил-2'-дезоксинуридин (BVDU) (≥400 мкг/мл и ≥300 мкг/мл соответственно) (Табл.1).

3'-Ацилоксиминопроизводные-2',3'-дидезоксинуклеозидов (соединения 4a-4e) показали сходные величины ингибирующих концентраций.

Соединения 1E и 3E+3Z оказались неактивными по отношению к штамму ВПГ-1 (TK<sup>-</sup>) (B2006), дефицитному по тимидинкиназе, а соединения 2E+2Z ко всем изученным штаммам ВПГ, за исключением незначительной активности к штаммам ВПГ-1 (KOS) и ВПГ-2 (Lyons) в HEL клетках, с величинами EC<sub>50</sub> 50 мкг/мл и 35 мкг/мл соответственно.

АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА Б. Активность соединения 1E против ВГБ была изучена в культуре человеческих клеток 2.2.15, зараженных ВГБ. Соединения 1E и 4a показали значительную активность против вируса гепатита Б с EC<sub>50</sub> 0,25 мкг/мл и 1,5 мкг/мл соответственно, ингибируя вирусный репликативный ДНК-интермедиат в сравнении с контролем и не проявили цитотоксичности до концентрации 50 мкг/мл и 200 мкг/мл соответственно (SI>200). 3'-Оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозиды, содержащие другие природные нуклеиновые основания (соединения 11E+11Z, 14E+14Z и 17E+17Z) также показали активность против ВГБ с несколько меньшими величинами EC<sub>50</sub> 10 мкг/мл, 10 мкг/мл и 7 мкг/мл соответственно.

АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ДРУГИХ ВИРУСОВ. Исследуемые соединения не проявили активности и цитотоксичности против ряда ДНК- и РНК-вирусов, а именно: coxsackie virus, poliovirus, parainfluenza-3, reovirus-1, sindbis.



semliki forest. cytomegalovirus в различных культурах клеток (E<sub>6</sub>SM, HeLa, Vero, HEL). Соединения 1E, 3E+3Z, а также некоторые соединения структуры 4 показали низкую активность против varicella zoster virus, с величинами EC<sub>50</sub> 20-50 мкг/мл.

5

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА. Данные изучения цитотоксической активности показывают, что соединения по настоящему изобретению являются умеренно токсичными для культур клеток CEM/0 и MT-4 и малотоксичными в отношении E<sub>6</sub>SM, HEL и культур клеток HEP G2.

10

Таким образом:

-3'-оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозиды показывают значительную активность против следующих вирусов: ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вирус гепатита Б, ВПГ-1 и ВПГ-2, сопоставимую с активностью соединений, используемых в медицине для терапии заболеваний, вызываемых этими вирусами;

15

- соединение 1E является первым примером нуклеозидного аналога, показывающего активность против трех различных классов вирусов (РМЕА активен против ВИЧ и ВПГ, но неактивен в отношении вируса гепатита Б; <sup>3</sup>ТС активен против ВИЧ и вируса гепатита Б, но неактивен против ВПГ);

20

-одним из механизмов возникновения резистентности к антиВИЧ нуклеозидным аналогам и, в частности, к AZT является потеря способности подвергаться фосфорилированию человеческой тимидинкиназой в клетках, что исключает их дальнейшее последовательное превращение в активный нуклеозид-5'-трифосфат. Частичное сохранение антиВИЧ активности в CEM/TK<sup>+</sup> клетках тиминовыми оксимино-нуклеозидами 1E и 3E+3Z и практически полное сохранение активности цитозиновыми нуклеозидами 11E+11Z косвенно свидетельствует об отличиях в их механизмах действия по сравнению со структурными аналогами, что может позволить избежать проблемы клеточной резистентности при химиотерапии 3'-оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозидами.

25

30

- наиболее активные соединения в соответствии с настоящим изобретением - 1E, его ацетильные производные 3E+3Z являются синтетически

легко доступными соединениями. Так, **1E** синтезируется из тимидина в 3 стадии с неоптимизированным суммарным выходом 63%.

Таблица 1. Конформационные параметры аналогов **1E**<sup>a</sup> и **2Z**<sup>a</sup> в сравнении с тимидином<sup>b</sup> и AZT<sup>b</sup>.

Соединение	<b>1E</b>	<b>2Z</b>	AZT молекула 1	AZT молекула 2	dThd
Конформация относительно связи N1'-C1'	<i>анти</i>	<i>анти</i>	<i>анти</i>	<i>анти</i>	<i>анти</i>
$\chi$ (O4'-C1'-N1C2), (°)	-118,1	-118,9	-125,4	-172,0	-139,4
P. фазовый угол псевдовращения, (°)	115,6	147,7	173,3	212,2	187,8
$\Psi_m$ (Максимальная амплитуда псевдовращения), (°)	25,7	31,2	32,4	36,3	37,8
Конформация фуранозного цикла	C1'-экзо/ O4'-эндо	C1'-экзо/ C2'-эндо	C2'-эндо/ C3'-экзо	C2'-эндо/ C3'-экзо	C2'-эндо/ C3'-экзо
Конформация относительно связи C4'-C5'	<i>гаш</i>	<i>гаш</i>	<i>гаш</i>	<i>транс</i>	<i>транс</i>
$\gamma$ , (O5'-C5'-C4'-C3'), (°)	43,1	48,8	50,8	173,5	172,8

5

<sup>a</sup>Экспериментально полученные параметры:

<sup>b</sup>Параметры взяты соответственно из Young, D.V.; Tollin, P.; Willson, H.R.  
The crystal and molecular structure of thymidine. Acta Cryst. 1969. B25. 1423-1431.;

Гурская, Г.В.; Цапкина, Е.Н.; Скалцова, Н.В.; Краевский, А.А.; Линдеман, С.В.; Стручков, Ю.Т. Рентгеноструктурное исследование специфического ингибитора обратной транскриптазы - 3'-азидо-2',3'-дифлюоро-2'-дезокситимидина. Докл. Акад. Наук СССР. 1986. 291. 854-859.

10

Таблица 2. Активность некоторых 3'-оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозидов против ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и клеточная токсичность в человеческих МТ-4 и СЕМ клетках\*

Соединение	EC <sub>50</sub> , мкг/мл**				CC <sub>50</sub> , мкг/мл***				SI*	
	ВИЧ-1				ВИЧ-2				для ВИЧ-1 и ВИЧ-2	
	MT-4	CEM/0	MT-4	CEM/0	CEM/TK-	MT-4	CEM/0	CEM/TK-	MT-4	CEM/0
<u>1E</u>	0,025	0,40	0,03	0,35	20	1,6	9,9	>100	53-64	25-28
<u>2E+2Z</u>	3,3	26	4,6	27	>100	182	>200	>200	39-55	>8
<u>3E+3Z</u>	0,05	1,0	0,05	0,80	>20	7,1	104	>200	142	104-130
<u>11E+11Z</u>	---	19	---	16	58	---	>250	---	---	>14
<u>14E+14Z</u>	---	185	---	167	---	---	>250	---	---	>1,5
<u>15E+15Z</u>	---	140	---	150	---	---	>250	---	---	>1,7
<u>AZI</u>	0,0005	0,0007	0,0007	0,0009	>25	1,5	>100	>200	2100-3000	>30000

\*Эксперименты проводились с штаммами ВИЧ-1 (III<sub>B</sub>) и ВИЧ-2 (ROD) в МТ-4 или СЕМ/0 и СЕМ/ТК- клетках. Индекс селективности SI был рассчитан по формуле: SI = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>. СЕМ/ТК- клетки, дефицитные по тимидинкиназе. AZI - 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидин.

\*\*Эффективная концентрация или концентрация необходимая, чтобы защитить МТ-4 клетки от цитопатогенного действия ВИЧ или защитить СЕМ/0 клетки от вызванного ВИЧ образования гигантских клеток на 50%

\*\*\*Цитотоксическая концентрация или концентрация необходимая, чтобы уменьшить выживаемость клеток на 50%

Таблица 3. Активность некоторых 3'-оксимино-2',3'-дидезоксиинуклеозидов против ВПГ-1 и ВПГ-2 и клеточная резистентность в E<sub>6</sub>SM и HEL клетках

HEL клетках

Соединение		Минимальная цитотоксическая концентрация, мкг/мл *	EC 50, мкг/мл **													
			ВПГ-1 (KOS) B		ВПГ-1 (F) B		ВПГ-1 (Mc Intyre) B		ВПГ-2 (G) B		ВПГ-2 (196) B		ВПГ-2 (Lyons) B		ВПГ-2 (B2006) B	
			E <sub>6</sub> SM	HEL	E <sub>6</sub> SM	HEL	E <sub>6</sub> SM	HEL	E <sub>6</sub> SM	HEL	E <sub>6</sub> SM	HEL	E <sub>6</sub> SM	HEL	E <sub>6</sub> SM	HEL
1E		>400	0.4	1.4	0.5	1.3	0.85	0.5	0.7	0.5	1.1	1.4	0.31	≥200	>50	
2E+2Z		>200	>200	50	>200	>200	>50	>50	>200	>50	>200	>200	35	>200	>50	
3E+3Z		400	0.9	3.8	5	2	2.7	2.8	1	2.8	70	4	2	>200	>5	
BVDU***		≥300	0.007	0.005	0.02	90	0.003	30	90	30	>400	>400	5	10	50	
ribavirin		>400	60	---	80	90	---	---	50	---	150	100	---	150	---	
DHPG***		>100	0.001	---	0.002	0.003	---	---	0.002	---	0.006	0.002	---	5	---	
ACG		≥400	0.01	---	0.02	0.006	---	---	0.009	---	0.02	0.004	---	100	---	

изменение нормальной клеточной

\* Минимальная цитотоксическая концентрация, вызывающая микроскопически определяемое изменение нормальной клеточной морфологии через 2 дня после инкубации

\*\* Концентрация, необходимая чтобы уменьшить вирусную цитопатогенность на 50%

\*\*\* BVDU -5-(E)бромвинил-2'-дезоксисуридин, DHPG -9-[(1,3-дигидроксипропил)оксиметил]гуанин

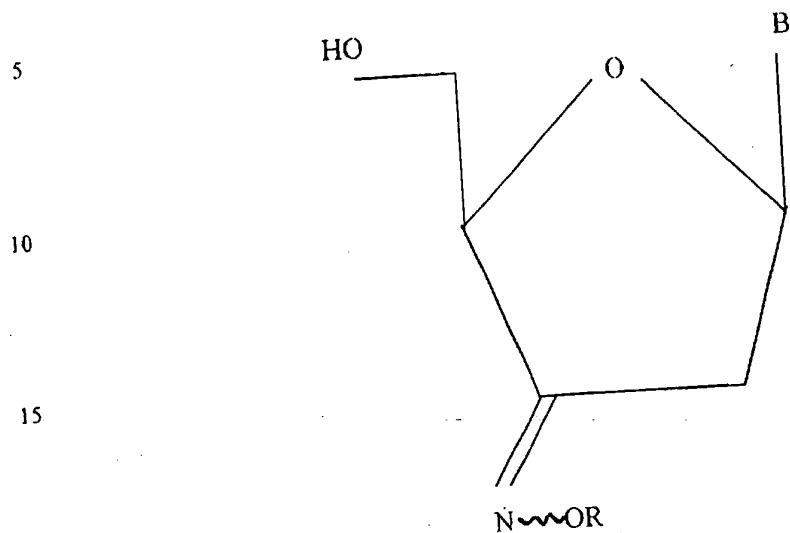
### Промышленная применимость

Настоящее изобретение применимо в фармацевтической промышленности для получения известными в органической химии методами новых производных

5 3'-оксимино-2,3'-дидезоксинуклеозидов, обладающих противовирусной активностью широкого спектра действия в отношении вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ), простого герпеса (ВПГ) и вируса гепатита Б (ВГБ).

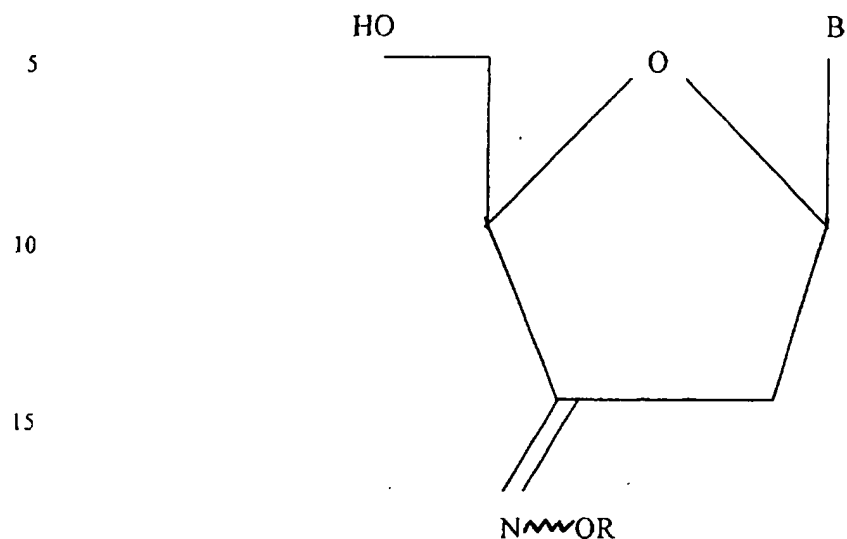
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

3'-Оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозиды формулы:



где В - незамещенный или замещенный тимин-1-ил, урацил-1-ил, цитозин-1-ил, аденин-9-ил и гуанин-9-ил, а R - C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> ацил.

1/2



- |    |  |  |
|----|--|--|
| 20 | <u>1E</u> . B=Thy R=H  | <u>15E+15Z</u> . B=Ado R=Ac                    |
|    | <u>2E+2Z</u> . B=Thy R=Me  | <u>16E+16Z</u> . B=Ado R=Me                    |
|    | <u>3E+3Z</u> . B=Thy R=Ac  | <u>17E+17Z</u> . B=Gua R=H                     |
|    | <u>4E+4Z</u> . B=Thy R=Alk-C=O   | <u>18E+18Z</u> . B=Gua R=Ac                    |
|    | Alk= Et ( <u>4a</u> ); Pr ( <u>4б</u> ); iPr ( <u>4в</u> );  | <u>19E+19Z</u> . B=Gua R=Me                    |
| 25 | tBu ( <u>4г</u> ); C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> ( <u>4д</u> ); C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ( <u>4е</u> ) | <u>20E+20Z</u> . B=5-Et-Ura R=H                |
|    | <u>5E+5Z</u> . B=Thy R=H (β-L-аналог соед. 1)  | <u>21E+21Z</u> . B=5-Et-Ura R=Ac               |
|    | <u>6E+6Z</u> . B=Thy R=Me (β-L-аналог соед. 2)   | <u>22E+22Z</u> . B=5-Et-Ura R=Me               |
|    | <u>7E+7Z</u> . B=Thy R=Ac (β-L-аналог соед. 3)   | <u>23E+23Z</u> . B=5-CF <sub>3</sub> -Ura R=H  |
|    | <u>8E+8Z</u> . B=Ura R=H   | <u>24E+24Z</u> . B=5-CF <sub>3</sub> -Ura R=Ac |
| 30 | <u>9E+9Z</u> . B=Ura R=Ac  | <u>25E+25Z</u> . B=5-CF <sub>3</sub> -Ura R=Me |
|    | <u>10E+10Z</u> . B=Ura R=Me  | <u>26E+26Z</u> . B=5-I-Ura R=H                 |
|    | <u>11E+11Z</u> . B=Cyt R=H   | <u>27E+27Z</u> . B=5-I-Ura R=Ac                |
|    | <u>12E+12Z</u> . B=Cyt R=Ac  | <u>28E+28Z</u> . B=5-I-Ura R=Me                |
|    | <u>13E+13Z</u> . B=Cyt R=Me  |  |
| 35 | <u>14E+14Z</u> . B=Ado R=H   |  |

Рис. 1. Некоторые синтезированные 3'-оксимино-2',3'-дидезоксинуклеозиды (смесь E и Z-изомеров)

2/2

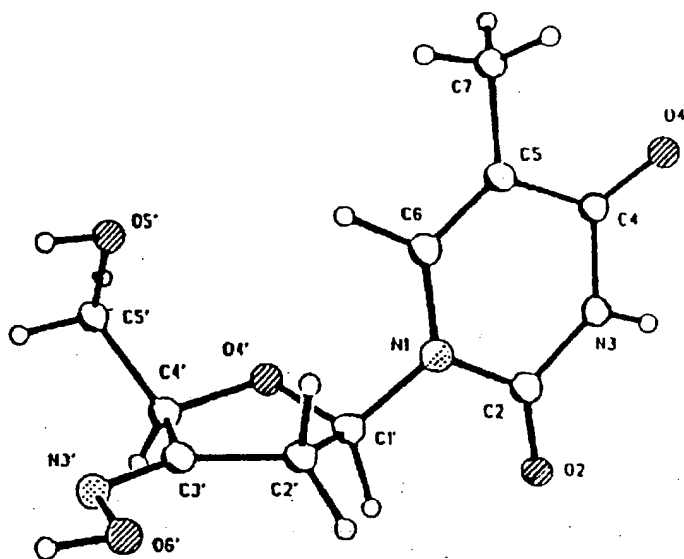
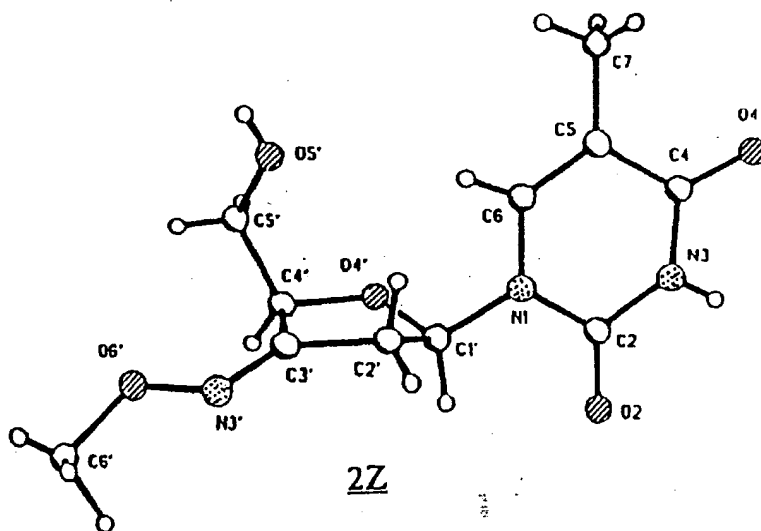
**1E****2Z**

Рис. 2. Трёхмерная структура нуклеозидных аналогов **1E** и **2Z**



# ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка  
PCT/RU 97/00201

## А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07H 19/073, 19/173, A61K 31/70

Согласно международной патентной классификации (МПК-6)

## В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-6

C07H 19/073, 19/173, A61K 31/70, C07D 307/02

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, поисковые термины):

## С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	EP 0505181 A1 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 23.09.92	1
A	EP 0306597 A2 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 15.03.89	1
A	EP 0378941 A2 (INSTITUT MERIEUX) 25.07.90	1
A	EP 0287215 A2 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 19.10.88	1
A	SU 1548182 A1 (ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ АН СССР и др.) 07.03.90	1
A	US 5387677 A (ACIC INC.) Feb. 7, 1995	1
A	US 4681933 A (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) Jul. 21, 1987	1

☒ последующие документы указаны в продолжении графы С.

☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

\* Особые категории ссылочных документов:

"А" документ, определяющий общий уровень техники

"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее

"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета

"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень

"У" документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории

"&" документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска:  
14 октября 1997 (14.10.97)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске:  
25 ноября 1997 (25.11.97)

Наименование и адрес Международного поискового органа:  
Всероссийский научно-исследовательский институт  
государственной патентной экспертизы,  
Россия, 121858, Москва, Бережковская наб., 30-1  
Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо:  
И.Федосеева  
Телефон №: (095)240-5888

Форма PCT/ISA/210 (второй лист) (июль 1992)

# ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №

PCT/RU 97/00201

## С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 89/08115 A1 (INSTITUT DE RECHERCHES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES APPLIQUEES) 8 septembre 1989 (08.09.89)	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 97/00201

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>6</sup> C07H 19/073, 19/173, A61K 31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H 19/073, 19/173, A61K 31/70, C07D 307/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0505181 A1 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 23 September 1992 (23.09.92)	1
A	EP 0306597 A2 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 15 March 1989 (15.03.89)	1
A	EP 0378941 A2 (INSTITUT MERIEUX) 25 July 1990 (25.07.90)	1
A	EP 0287215 A2 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 19 October 1988 (19.10.88)	1
A	SU 1548182 A1 (INSTITUT MOLEKULYARNOI BIOLOGII AN SSSR et al) 07 March 1990 (07.03.90)	
A	US 5387677 A (ACIC INC.) 07 February 1995 (07.02.95)	1
A	US 4681933 A (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 21 July 1987 (21.07.87)	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 October 1997 (14.10.97)

Date of mailing of the international search report

25 November 1997 (25.11.97)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

RU

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 97/00201

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 89/08115 A1 (INSTITUT DE RECHERCHES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES APPLIQUEES) 8 Septembre 1989 (08.09.89)	1